

For : The Patent Application

Our Ref.: NT1111US

LIST OF THE PRIOR ART DOCUMENTS CITED IN THE SPECIFICATION

1. H-7600 transmission electron microscope catalog No.
HTD-040 (issued in November 2001) of Hitachi High-
Technologies Corporation
2. "Electron Microscope", Vol.37, No.2, p.81-84 (2002)
3. K. Kanaya and S. Okayama: J. Phys. D: Appl. Phys.5 (1972) 43

List of prior art documents relevant to the present
invention:

1. Japanese Patent Application Laid-Open No.2000-243338

ABSTRACT (Translation)

Electron microscopic ISH (in situ hybridization) under development has almost the same procedure as that of usual immunostaining after embedding. More specifically, both the methods have the same procedure of fixing, embedding, and ultrathin section preparation, and have a different reaction process. These methods are therefore possible as indicated in Fig. 6.

電顕的 *in situ hybridization* (ISH) によるウイルス核酸分子の局在

キーワード:

postembedding, Lowicryl K4M, EB ウイルス, アデノウイルス,
ヒト免疫不全ウイルス (HIV)

後 藤 俊 幸

(^a 京都大学医療技術短期大学部)

1. はじめに

天然痘ウイルスのように 500 nm 程度の大きさのものもあるが、ウイルスの大部分は 200 nm 以下で一般の光学顕微鏡では観察できない。したがって、光顕用に開発されてきた *in situ hybridization* (ISH) も、電顕レベルで使えなければ、ウイルス学領域では十分には活用されないだろう。また、電顕的 ISH はウイルス学の分野においては実際どのように役に立つのだろう。今日まで電顕的 ISH が応用されたウイルスは、アデノウイルス、Epstein-Barr (EB) ウイルス、サイトメガロウイルス、ヒトパピローマウイルス、ヒト免疫不全ウイルス (HIV) などがある¹⁾。ここでは、我々が行ってきた光顕的 ISH から電顕的 ISH への応用例や問題点を示しながら、これからの展望を述べる。

2. ウイルスでの利用目的

ISH の応用として、感染細胞内のウイルス核酸の局在とウイルス粒子内の核酸の同定が考えられる。

2.1 感染細胞内の核酸の局在

ウイルスが細胞に侵入後、ウイルス遺伝子がそれを保護しているカプシドから抜け出て (脱殻)、ウイルス核酸の複製およびウイルス蛋白の合成、続いてウイルス粒子形成が行われる。次に完成したウイルス粒子が次の細胞へと感染を繰り返す。いわゆるウイルスの感染過程 (ライフサイクル) である。このウイルス感染過程中、脱殻からウイルス粒子形成までの間は、粒子構造が見えず、暗黒期とよばれている。この時期のウイルスの所在を検出する方法は、これまでウイルス蛋白を標的とした免疫電顕法が中心であった。しかし、ウイルス核酸だけしか存在しない時期では光顕的 ISH が主に用いられ、核内か細胞質内かのおおよその局在が示されてきた。しかし、さらに細かく、感染細胞内のどこに存在するか究明するために電顕的 ISH が必要となる。

2.2 ウイルス粒子内の核酸の同定

ウイルスの同定には、電顕観察により形態からウイルスの種類がおおよそ推定できるが、最終的には免疫電顕法が使われてきた。しかし、すべてのウイルスについて有効な抗体があるわけではない。塩基配列が既知のウイルスならば電顕的 ISH で同定は可能である。最近では C 型肝炎ウイルスのようにウイルス遺伝子が判明後、ウイルス粒子が検出された例も生じてきた。また、実際のウイルス粒子内にウイルス遺伝子が存在するのか、その粒子が遺伝子のない空粒子なのか、といったことを知ることもワクチンの検定の際にはとくに必要であろう。

3. ウイルスでの電顕的 ISH の問題点と解決法

現在に至るまで、なぜ電顕的 ISH が汎用されなかったのであろうか。その理由として、まず開発された当時は放射性同位元素を用いた電顕的オートラジオグラフィ法で行われ、操作方法の煩雑さや再現性などに多くの問題があった。しかし、1980年代に入り、核酸にビオチンやジゴキシンゲンを標識することができ、特別な施設を必要としない通常の免疫電顕と同様の手法で行えるようになった。また、免疫電顕法も包埋前に免疫反応を終え、その後包埋して観察する包埋前染色法 (preembedding) から、金コロイド標識を用いることによって包埋後超薄切片上で免疫反応させる包埋後染色法 (postembedding) が近年飛躍的に発達してきた。これらの方法が電顕的 ISH に応用されるようになってきたが、現在でも核酸の標識法や観察される電顕の像質の問題など、問題点は少なくない。

そこで、我々はすでに確立している光顕的 ISH 法を、電顕に適用するところから始めた。

3.1 包埋後染色法による光顕的 ISH から電顕的 ISH へ
パーキットリンバ腫や伝染性単核症の病因ウイルスである EB ウイルスは二重鎖 DNA ウイルスで、全長約17万塩基対の一部に3072塩基の繰り返し部分 (*Bam*HI-W) を10回以上含んでいる。そのため、その繰り返し単位1つをプローブとすると、繰り返えしの数だけ感度が増すことになる。*Bam*HI-W 断片が組み込まれているプラスミド (pBR322) にニックトランスレーション法でビオチン標識し、これをプローブとする。つぎにハイブリダイゼーション反応液として、通常

Toshiyuki Goto: Localization of viral nucleic acid molecules by electron microscopic *in situ hybridization*

^a 〒606-8507 京都市左京区聖護院川原町53

TEL: 075-751-3925; FAX: 075-751-3909

E-mail: tgoto@itan.kyoto-u.ac.jp

2002年5月20日受付

よく用いられている一般的な液で、ハイブリッド形成温度を下げるホルムアミド、非特異反応を抑える DNA (イワシなどの DNA) や反応液の濃縮をはかり反応を効率化するデキストランなどを緩衝液 (2×SSC) に加えた液である。この時、光顕的 ISH と電顕的 ISH とにおいてほぼ同じ操作手順で行い、ただ銀増感時間だけを調節することによって、両 ISH を観察するようにした。すなわち、1 nm の金標識された抗ビオチン抗体を用いて銀増感法の反応時間の調節で、小さい粒子の電顕用から大きな粒子の光顕用まで作った。EB ウイルスの場合、非感染細胞と感染しているウイルスゲノムのコピー数が異なる培養細胞を数種用いることができる。光顕的 ISH を行くと、EB ウイルスに感染していない (コピーのない) 細胞では反応がなく、それぞれ異なるコピー数をもつ細胞においてはその数に相応するだけの反応を半定量的に得られた (図 1)²⁾。

つぎに、銀増感の反応時間を短くして、電顕的 ISH を行

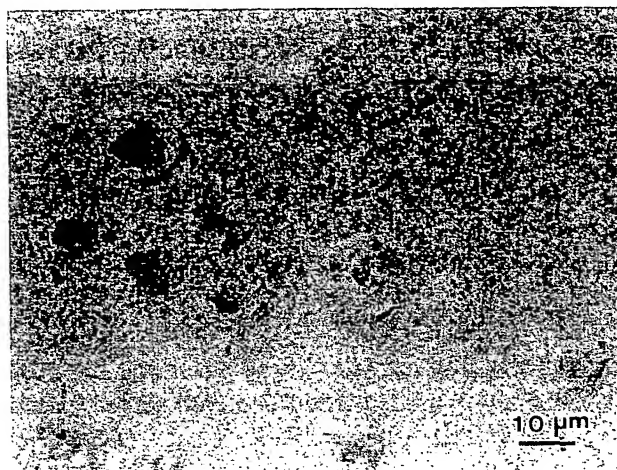


図 1 EBV 感染細胞の光顕的 *in situ* hybridization. 微分干涉顕微鏡像。細胞の核に反応が多くみられる。



図 2 EBV 感染細胞の電顕的 *in situ* hybridization. 核内や細胞外に反応がみられる。細胞外では粒子上にも反応がみられる (矢印)。スケールは 1 μm。

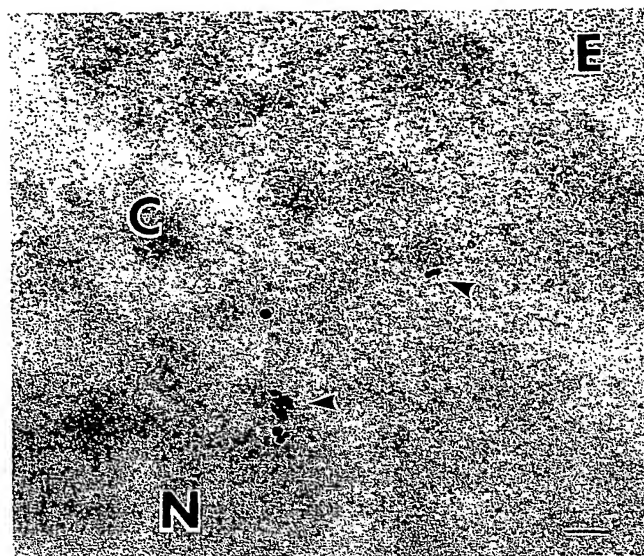


図 3 EBV 感染細胞の電顕的 *in situ* hybridization の高倍率像。矢頭は形成中ウイルスを示す。N: 核, C: 細胞質, E: 細胞外。スケールは 100 nm。

うと、図 2 のように、感染細胞の核内に多く反応が見られた。また、細胞質内でウイルス粒子が形成中の段階でも標識され (図 3 の矢頭)、光顕 ISH よりも詳しい情報が得られるようになった。

しかし、できる限り小さく、また粒子のそろった反応生成物を作ろうとした場合、銀増感のコントロールが難しく、細胞外のウイルス粒子の存在は増感された銀粒子によってマスクされる場合が多かった (図 2 の矢印)。また、細胞やウイルスの染色性が悪いので、ウイルス同定が難しかった。

ここで問題点を整理すると、①ウイルスのように比較的高倍率で観察しなければならない試料の場合、高コントラスト像を得る必要があった。②ISH の結果の良否が判定しがたいため、どの方法・条件が最適なのか判断が難しく、試行錯誤を繰り返すばかりであった。③ISH の反応が弱いため、①と同じく高倍率にすると 1 ウイルス粒子あたりの反応粒子数が少ないため、客観的信頼性に欠ける傾向があった。このような電顕的 ISH 法の問題点を克服するため、種々の方法を検討した。

3.2 問題点の解決例

我々の方法は大きくは包埋後染色法の範疇に入る。すなわち、包埋剤として用いられる低温重合樹脂 Lowicryl K4M を用いている。そこでこのコントラストの増強のため、免疫反応後に、ルテニウム・レッド/四酸化オスミウムの染色を行い、改善を図った³⁾。なお、四酸化オスミウムを後染色として使用しているが、反応粒子数の減少はみられなかった。次に、定量的に判定できる試料として、アデノウイルス感染細胞を用いた。アデノウイルスは細胞に感染すると、細胞内で多くのウイルス粒子が成熟し、場合によってはこの粒子が細胞内で規則的に配列する。そこで、この結晶配列の粒子で

の反応から、定量化の可能性が考えられた。もちろん、試料切片の切れ方によって極端に偏りが生じることは否めない。そこで、粒子径が周辺の粒子に比べて極端に小さい粒子は測定から除外した。ウイルス粒子には1コピーのウイルスゲノムがあり、プローブとは1:1の対応となる。さらに結晶配列していることから、どの個々のウイルスとの反応かはわからないが、ある区域内での反応金粒子の数を測定すると平均の反応数が計測される。また、今後の汎用性のため、抗ビオチン抗体とその抗体に反応する金標識の抗体を用いる、いわゆる間接免疫反応を行った。そのため、抗体分子の2倍の距離(約30 nm)離れた金粒子まではISH反応していると考え、計算に組み入れた。以上のような仮定を設けて電顕的ISH反応の各処理段階での最適条件を定量的に判断した。

さらに、一定の安定した条件を得るためには、粒子径を一定にコントロールするのが難しい銀増感法は不向きである。そこで、反応が安定し、金粒子数が測定しやすく、粒径分布幅の少ない10 nm径の金粒子を用いた。プローブの選択では、まずアデノウイルスのビオチン標識したもの(Enzo Biochem. Inc., NY, USA)が市販されているので、それを購入し、そのまま上記の条件で行った⁴⁾。これにより、最適温度、最適反応時間などの諸条件が決定された。それによると、包埋樹脂では、低温度重合樹脂のLowicryl K4M, LR Whiteと通常のエポキシ樹脂包埋切片を比較すると、Lowicryl K4MとLR Whiteとは反応性にはほとんど差はなかったが、エポキシ樹脂では全く反応性がなかった(図4)。

反応温度は37°C、反応時間(ハイブリダイゼーション時間)は12~14時間で最適であった。ただ、プローブを標識物に近づきやすくするため、前処理としてプロテアーゼKによる酵素処理を行っても反応性は極端には向上しなく、むしろ、形態の保持は悪くなった。さらに、反応性を高めるため、市販のものをさらにrandom primingによりプローブのビオ

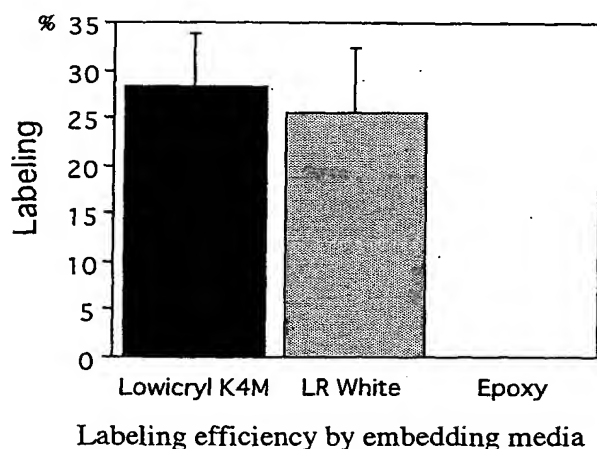


図4 Lowicryl K4M, LR White, エポキシ各樹脂包埋剤を使用したときの電顕的 *in situ* hybridization の反応性の比較。試料はアデノウイルス感染細胞内の結晶様配列内のウイルス粒子。

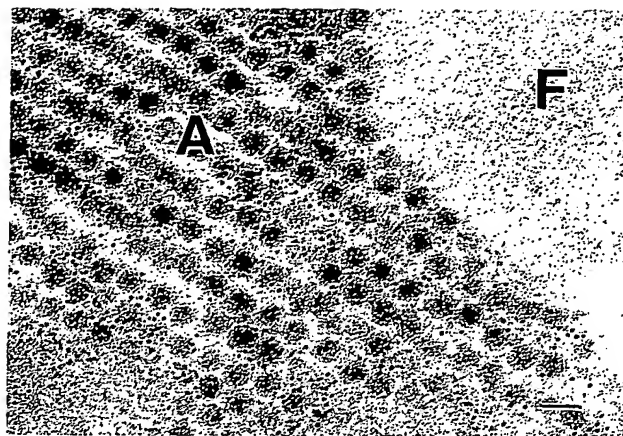


図5 アデノウイルス感染細胞の電顕的 *in situ* hybridization. A: ウイルスの結晶様配列, F: ウイルス蛋白でできた線維状構造物. ISH 反応は A の領域のみである。スケールは100 nm。

チン標識量を多くすると、反応した金粒子数が増加した(図5)⁴⁾。

以上のようにして、現在までに得られた最適な電顕的ISH反応条件をまとめると、

2%パラホルムアルデヒドと0.05%グルタルアルデヒド混合液(緩衝液はPBS)で1時間固定し、包埋剤としてLowicryl K4Mを用いる。試料の2本鎖を1本鎖にする変性法として、50%ホルムアミド中で、92°Cで2~3分処理する。ハイブリダイゼーション反応は37°Cで14~16時間行い、反応したビオチンの検出法として抗ビオチン・ウサギIgGと金標識抗ウサギIgG抗体を使用する。染色は酢酸ウラニル、クエン酸鉛の通常二重染色で行う。なお、コントラストのない試料はこれらの染色の前に、ルテニウム・レッド/四酸化オスミウム染色をする。

4. 応用範囲の拡大

プラスミドを用いた検出法は、応用範囲に限られる。そこで、多くの材料にも利用できる方法として、核酸データベースの利用が考えられる。現在多くの生物の塩基配列はデータベース化され、インターネットによって容易に入手することができる。抗体を手に入れるのは難しいが、塩基配列の情報を得ることは非常に簡単になってきた。そこで、そのデータベースから目的の微生物の塩基配列を入手し、その配列から適当なプローブを作製すればよい。もちろん、今までの文献で紹介された塩基配列、たとえば、PCRでよく用いられているプライマーなどの情報も役に立つ。また、この方法は重篤な感染を起こすウイルス検出の場合、病原性があると考えられる部分を除いた塩基配列を用いることにより、比較的に取り扱うことができるだろう。すなわち、ウイルスの全塩基配列を用いる実験ではバイオセーフティ実験室内で行う必要があるが、安全な塩基配列部分を用いた検出の場合、試

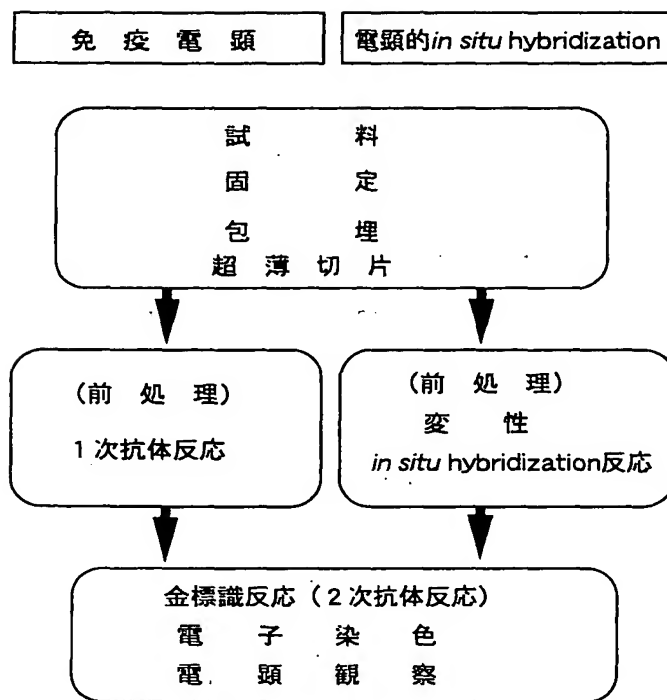


図 6 免疫電顕と電顕的 *in situ* hybridization (ISH) との比較.

料が固定されていれば、通常の実験室でも実験が可能である。HIV を検出する際には、PCR 産物の検出用に使われている 30~40塩基のプローブに注目し、その末端をビオチン標識し電顕的 ISH を行った。使用したプローブは HIV の LTR と *gag* 部分の 2 種類で、それぞれ 1 種類のプローブで反応を行った場合は、有意な反応はみられなかったが、2 種類のプローブを使用すると標的核酸に有意に反応がみられ、短いプローブの利用も可能であることがわかった⁵⁾。

5. おわりに

現在開発している電顕的 ISH は通常の包埋後免疫染色法とほとんど同じ方法で行っている。すなわち、固定・包埋・超薄切片作製までは同じで、反応系だけを変えれば、両方の方法が可能である (図 6)。

最近とくに、目的のウイルス核酸とその生成物である蛋白との関係を明らかにしたい、という要望が強まっているが、この図から、同じ切片上で 2 つの反応が可能であることが示唆されている。ただ問題点は、熱で変性を行うことである。しかし、試料が高温処理した後でももとの抗原性が保持できればよい。これは用いる抗体の種類にもよるが、前述の HIV *gag* 蛋白に対する抗体で反応させると、非加熱の試料と比べても、有意な差は認められず、高温処理でも抗原性が保てることが認められた。通常、抗体の特異性を調べる場合、ウェスタンブロットでよく調べられている。その際、電気

泳動の前処理として試料蛋白を加熱による SDS 処理が一般に行われている。したがって、多くの抗体は ISH の変性処理を施しても試料中の蛋白の変性による抗原性の減少はあまり起こらないかもしれない。最近、免疫染色法と ISH の 2 重反応は、ヒトヘルペス 1 型ウイルスで良好な結果が得られており⁶⁾、今後、さらに反応性のよい ISH 用プローブが作り出されたならば、適切な抗体とを組み合わせ、ウイルス核酸とその蛋白の局在が同時に観察する研究がますます盛んになるであろう。

文 献

- 1) 後藤俊幸, 中井益代: 電子顕微鏡, 36, 57-60 (2001)
- 2) Goto, T., Kohno, T., Wu, H., Hironaka, T., Hirai, K. and Nakai, M.: *J. Electron Microsc.*, 46, 431-437 (1997)
- 3) Kohno, T., Fujioka, Y., Goto, T., Morimatsu, S., Morita, C., Nakano, T. and Sano, K.: *J. Virol. Methods*, 72, 137-143 (1998)
- 4) Goto, T., Kohno, T., Nakano, T., Fujioka, Y., Morita, C. and Sano, K.: *J. Electron Microsc.*, 50, 73-76 (2001)
- 5) Goto, T., Nakano, T., Morita, C., Kakimoto, K., Wu, H., Kawabe, K., Morimatsu, S., Imura, S., Sano, K., Hirai, K. and Nakai, M.: Sixth Asia-Pacific Conference on Electron Microscopy. 1996, p.473-474
- 6) Morioka, H., Kobayashi, K., Tachibana, M. and Imanishi, J.: *J. Electron Microsc.*, 48, 621-628 (1999)